

Klebsiella pneumoniae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı ve Beta-Laktam Antibiyotik Direncinin Araştırılması

Ramazan Akyıldız¹, M. Fevzi Özsoy¹, Hüsnü Altunay¹, Nafiz Koçak¹, Şaban Çavuşlu¹, O. Şadi Yenen²

Özet: Bu çalışmada Haziran 1994-Mayıs 1996 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 67 *Klebsiella pneumoniae* suşunda çift diskli sinerji ve üç boyutlu test ile ESBL sıklığı araştırılmış, ayrıca disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile E testi (30 suş için) kullanılarak beta-laktam antibiyotiklerden seftriakson, sefotaksim, seftazidim, sefoksitin ve aztreonama karşı direnç durumu incelenmiştir. Çalışılan 67 *K. pneumoniae* suşunun 10'unda (%15) ESBL varlığı saptanmıştır. ESBL varlığı, bu 10 suşun 8'inde her iki yöntemle, birinde yalnız çift diskli sinerji testi ile ve diğerinde yalnız üç boyutlu test ile belirlenmiştir. Beta-laktam antibiyotiklere karşı en yüksek direnç oranları, disk difüzyon yöntemi ile sefoksitine (%28), mikrodilüsyon yöntemi ile seftriaksona (%42) ve E testi ile seftriaksona (%50) karşı bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Klebsiella pneumoniae*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotikler.

Summary: The frequency of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and detection of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. In this study, the frequency of ESBL investigated in the 67 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens in the laboratory of Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Haydarpaşa Teaching Hospital of Gülhane Military Medical Academy between June 1994 and May 1996. The double-disk synergy and three dimensional tests were used for detection of ESBL. The resistance to ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, cefoxitin and aztreonam was also investigated by the disk diffusion, microdilution and E test (for only 30 strains) methods. Ten of the 67 *K. pneumoniae* strains (15%) had ESBL. In eight of these 10 strains, the ESBL production was identified by both tests, while in one of the strains only by double disk synergy test, and in the other one by three dimensional test alone. In 67 *K. pneumoniae* strains, the highest resistance was 28% to cefoxitin with disk diffusion method, and 42% to ceftriaxone with microdilution method. Thirty strains investigated by E-test showed the highest resistance for ceftriaxone as 50%.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, extended-spectrum beta-lactamases, beta-lactam antibiotics.

Giriş

Tüm beta-laktam antibiyotikler, bakterilerin sitoplazmik membranları üzerindeki penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lere bağlanıp peptidoglikan sentezinin inhibisyonuna ve hücre duvar yapısının bozulmasına yol açarak etkilerini gösterirler. Buna karşın bakteriler, [a] beta-laktamaz enzimleri sentezleyip antibiyotiklerin beta-laktam halkalarını parçalayarak, [b] PBP'lerin yapısında değişiklik yapıp antibiyotiklerin bağlanmasını engelleyerek ve [c] Gram-negatif bakterilerde bunlara ilave olarak dış membranlarında bulunan ve antibiyotiklerin geçtiği kanalları (porin) daraltarak veya sayılarını azaltarak direnç geliştirirler (1,2).

Beta-laktam antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren beta-laktamazlar, bakteriler tarafından ya kromozomlar veya plazmid ya da transpozon adı verilen transfer edilebilir genetik elemanlar aracılığı ile sentez edilirler (3,4). TEM ve SHV tipi enzimler yapılarındaki bir veya birkaç amino asid değişikliği ile etki spektrumlarını çok genişletip 3. kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı da parçalayabilir. Bu özelliğe sahip enzimlere ESBL adı verilmiştir. Halen 30'a yakın ESBL tanımlanmış olup, yeni enzimlerle bu sayı sürekli olarak artmaktadır (5). Bu nedenle ESBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisi için beta-laktam seçiminde çok dikkatli olunmalıdır. Son zamanlarda TEM ve SHV kökenli olmayan yeni plazmid kaynaklı ESBL'ler de tanımlanmıştır. Bu yeni enzimler sefamisinler de dahil bütün sefalosporinlere karşı etkilidirler (6-8).

ESBL'ler başta seftazidim olmak üzere tüm 3. kuşak sefalosporinlere ve aztreonama karşı direnç gelişmesine neden olurlar. Bu enzimleri taşıyan bakteriler piperasilin ve mezlosilin gibi geniş spektrumlu penisilinlere karşı da direnç gösterirler. ESBL taşıyan bakteriler çoğu zaman deği-

(1) GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Haydarpaşa-İstanbul

(2) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul

3. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler (16-22 Mayıs 1997, Kuşadası) ve 12. Antibiyotik ve Kemoterapi (Ankem) Kongresi (2-6 Haziran 1997, Antalya)'nde bildirilmiştir

Tablo 1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Duyarlı, Orta Duyarlı ve Dirençli Suşların Sayı ve Yüzdeleri

Antibiyotikler	Disk Difüzyon (n=67)			Mikrodilüsyon (n=67)			E Testi (n=30)		
	Duyarlı n (%)	Orta n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Orta n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Orta n (%)	Dirençli n (%)
Seftriakson	37(55)	13(19)	17 (25)	37 (55)	2 (3)	28 (42)	14 (47)	1 (3)	15 (50)
Sefotaksim	37 (5)	13 (19)	17 (25)	39 (58)	4 (6)	24 (36)	15 (50)	3 (10)	12 (40)
Seftazidim	41 (61)	8 (12)	18 (27)	35 (52)	5 (8)	27 (40)	15 (50)	1 (3)	14 (47)
Sefoksitin	45 (67)	3 (5)	19 (28)	34 (51)	6 (9)	27 (40)	17 (57)	3 (10)	10 (33)
Aztreonam	38 (57)	12 (18)	17 (25)	38 (57)	7 (10)	22 (33)	17 (57)	1 (3)	12 (40)

şık mekanizmalarla beta-laktam dışındaki antibiyotik gruplarına karşı da (aminoglikozidler ve kinolonlar gibi) direnç geliştirebilirler. Bu bakteriler karbapenem türevlerine karşı nadiren direnç gösterirler ve genellikle duyarlı kabul edilebilirler (9).

ESBL taşıyan bakterilerin sıklığı genellikle yoğun bakım servislerinde kullanılan geniş spektrumlu penisilin veya sefalosporinlerin kullanımı ile doğru orantılıdır (10). ESBL üreten klinik izolatların çoğunu, hastanede yatan hastalardan izole edilen ve en çok nozokomiyal salgın sebebi olan *Klebsiella pneumoniae* suşları oluşturmaktadır (10,11). ESBL üreten suşlarla oluşan salgınlar, daha çok hastanede uzun süre kalanlarda, operasyon geçirenlerde, arteriyel ve üriner kateteri olanlarda ve özellikle yoğun bakım servislerindeki hastalarda oluşmaktadır (5,12).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bir Gram-negatif bakterinin (özellikle *K.pneumoniae* ve *Escherichia coli*) antibiyotik duyarlılığına bakılarak ESBL taşıyıp taşımadığı hakkında fikir sahibi olunabilir. Buna göre, ESBL taşıyan bakteriler aztreonam ve 3. kuşak sefalosporinlere ve geniş spektrumlu penisilinlere karşı direnç gösterirken; sefoksitin, beta-laktamaz inhibitörleri ve karbapenemlere karşı duyarlılıklarını genellikle sürdürürler (10).

Bu çalışmada GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında ESBL sıklığı ve çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnç durumunun araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Bu çalışmada Haziran 1994-Mayıs 1996 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 67 *K. pneumoniae* suşunda ESBL sıklığı çift diskli sinerji ve üç boyutlu test ile saptandı ve beş değişik beta-laktam antibiyotiğe direnç durumu Bauer-Kirby disk difüzyon, mikrodilüsyon ve E testi (30 suş için) yöntemleriyle in vitro araştırıldı.

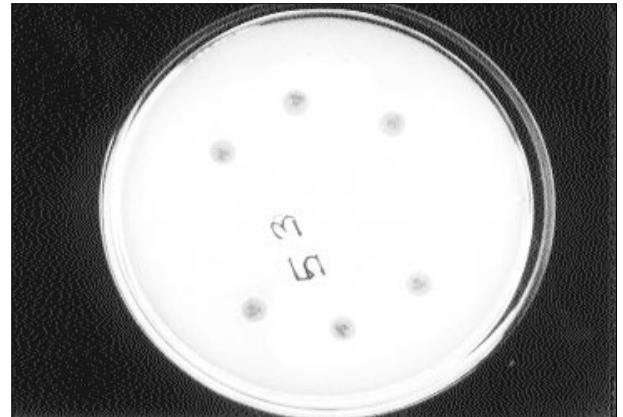
Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri NCCLS önerileri (13) doğrultusunda uygulandı. Kontrol suşu olarak ATCC 25922 *E. coli* kullanıldı. E testi için disk difüzyon yönteminde olduğu şekilde Petri kutuları içerisinde 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller-Hinton agarı (Oxoid) kullanıldı ve agar yüzeyine 0.5 Mc Farland bakteri süspansiyonu inoküle edildi. Üzerine V şeklinde 2'şer adet plastik antibiyotik stripleri (AB Biodisk, İsveç) yerleştirilerek 35°C'de 18 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda oluşan elips şeklindeki zonun plastik stripi kestiği noktada

okunan rakam, o suş için o antibiyotiğin MIC değeri olarak kaydedildi (1,14).

Beta-laktam antibiyotiklerden seftriakson, sefotaksim, seftazidim, sefoksitin ve aztreonam kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde NCCLS'in önerdiği yorumlama kriterleri esas alındı.

Çift Diskli Sinerji Testi: Deneyin tüm aşamalarında disk difüzyon yönteminin standartları sağlandı. Suşların yayıldığı Mueller-Hinton agarının yüzeyine diskler merkezden merkeze uzaklığı 20 mm olacak şekilde dispansır ile yerleştirildi. Buna göre sekiz gözlü dispansırın karşılıklı iki gözüne amoksisilin-klavulanik asid ve bunlardan birisinin çevresindeki gözlere aztreonam ve sefoksitin, diğer amoksisilin-klavulanik asid gözünün çevresine ise sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirildi. 18-20 saat süreyle 35°C'de inkübe edilen besiyerleri incelendiğinde, aztreonam, sefoksitin, seftazidim ve sefotaksime ait inhibisyon zonlarının klavulanik asid diski karşısında bozularak genişlemesi ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üreme olmayan bir bölgenin görülmesi, diğer bir deyimle klavulanik asidin antibiyotiği güçlendirmesi durumunda o suşun ESBL ürettiğine karar verildi (Şekil 1) (15,16). Deneyde kontrol olarak ESBL üretmediği bilinen ATCC 25922 *E. coli* kullanıldı.

Üç Boyutlu Test: Disk difüzyon yönteminin esas alındığı bu deneyin ondan teknik olarak farkı, ek olarak Petri kutusunun merkezine yakın tarafta ve antibiyotik disklerinin 3 mm uzağından besiyerinin dairesel bir şekilde kesilerek yarık açılmasıdır. Kesi işlemi, tasarımı kendimize ait olan ve T.C. Dz. K. K.lığı Taşkızak Tersanesi'nde özel olarak yap-



Resim 1. Çift diskli sinerji testi.

tırılan, ucu 11 no.'lu bisturi kalınlığına eşit olacak şekilde dairesel bıçak taşıyan bir alet ile yapıldı (Şekil 2).

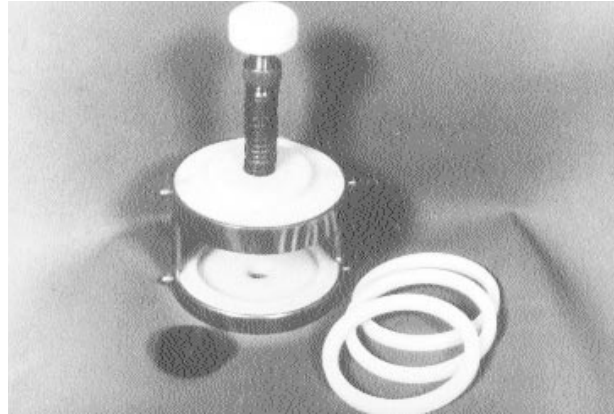
Bu yöntemin esası kesilen yarığa ekilen suşun ESBL üretip üretmediğinin saptanmasıdır. Eğer yarığa ekilen suş ESBL üretiyorsa, antibiyotiklere ait inhibisyon zonunda yarığın hizasında bozulma ya da kesilme görülecektir (Şekil 3). Bu test direkt ve indirekt olarak uygulanabilir. Direkt yöntemde 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşit olacak şekilde hazırlanan test edilecek bakteri süspansiyonu 4 mm kalınlığında hazırlanan Mueller-Hinton agarının yüzeyine sürülür. Kesilen yarığın içerisine ise yaklaşık olarak 10^9 - 10^{10} bakteri yoğunluğuna eşit olacak şekilde hazırlanan aynı bakterinin süspansiyonu inoküle edilir. İndirekt yöntemde besiyerinin yüzeyine kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinen bir suş sürülür. Yarığın içerisine de yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan test edilecek suş inoküle edilir. Bu çalışmada indirekt yöntem kullanıldı ve besiyerinin yüzeyine 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşit olacak şekilde hazırlanan ATCC 25922 *E.coli* suşunun kültürü sürüldü. Ardından bütün besiyerlerinin dairesel kesi işlemi yapılarak seftriakson, seftotaksim, seftazidim ve aztreonam diskleri Oxoid disk dispensarı kullanılarak yerleştirildi. Yarığın içerisine test edilecek bakteri süspansiyonu steril mikropipet kullanılarak taşınacak şekilde inoküle edildi. 35°C'de 18-20 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve sonuçlar çıplak gözle değerlendirildi (15-17).

Sonuçlar

Bu çalışmada 67 *K. pneumoniae* suşundan çift diskli sinerji testi ve üç boyutlu yöntem ile ayrı ayrı 9 suşta (%13), toplam olarak 10 suşta (%15) ESBL üretimi saptanmıştır. Her iki yöntemle de ayrı ayrı ESBL ürettiği saptanan birer suşta diğer yöntemle ESBL saptanamamıştır.

Ayrıca 5 değişik beta-laktam antibiyotiğe direncinin araştırıldığı çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile %25-28 arasında, mikrodilüsyon yöntemi ile %33-42 arasında direnç saptanmış olup en yüksek direncin disk difüzyon yönteminde sefoksitine, mikrodilüsyon yönteminde ise seftriaksona ait olduğu belirlenmiştir. 30 suşta uygulanabilen E testinde direnç oranı %33-50 arasında bulunmuş olup, en yüksek direnç oranı seftriaksona aittir (Tablo 1).

Disk difüzyon yöntemi ile beta-laktam antibiyotiklere orta derecede duyarlı bulunan suşlar mikrodilüsyon yöntemi ile denendiğinde, seftriaksona 13 suştan 11'i, seftotaksime 13 suştan 6'sı, seftazidime 8 suştan 3'ü, sefoksitine 3



Resim 2. Üç boyutlu teste besiyerini kesmek için kullanılan alet.

suştan 3'ü ve aztreonama 12 suştan 4'ü dirençli bulunmuş; ayrıca 1 suşun seftotaksime duyarlı olduğu saptanmıştır.

Disk difüzyon yöntemiyle beta-laktam antibiyotiklere orta derecede duyarlı bulunan suşlardan E testi çalışılan 30'u arasında seftriaksona 9 suştan 8'i, seftotaksime 9 suştan 4'ü, seftazidime 3 suştan 3'ü, sefoksitine 2 suştan 2'si ve aztreonama 3 suştan 1'i dirençli bulunmuştur.

Beta-laktam antibiyotiklere disk difüzyon yöntemi ile orta derecede duyarlı bulunan suşlardan çift diskli sinerji testi ve üç boyutlu test ile ESBL üretimi saptanan suşların sayısı ve yüzdeleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

İrdeleme

Enterobacteriaceae familyasında bulunan birçok suşun bunlar arasında da en fazla *K.pneumoniae* suşlarının ESBL ürettikleri bilinmektedir. Bunun nedeni kesin olarak belirlenmemiştir. Kimi yazarlar *K. pneumoniae* suşlarında spontan mutasyonların daha sık olarak gerçekleştiği fikrini öne sürmüşlerdir (18). Yoğun bakım servislerinde yatan, yeni cerrahi girişim geçirmiş, invazif girişim veya kateter uygulanmış, uzun süreli hastanede yatan hastalar ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında (hastane suşları) ESBL üretme sıklığı daha fazladır (10). Bu hasta gruplarından izole edilen ve beta-laktam antibiyotiklere orta derecede duyarlı bulunan *K. pneumoniae* suşlarının ESBL üretebilecekleri ve gerçekte dirençli olabilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır.

ESBL direnci, mikrodilüsyon testlerindeki standart inokulumdan daha yoğun inokulumların kullanıldığı dilüsyon yöntemi, çift diskli sinerji yöntemi, üç boyutlu yöntem ve E testi ile saptanabilmektedir (16). Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı çift diskli sinerji yöntemidir. Bir çalışmada disk difüzyonla geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı olarak tanımlanan bakterilerin yaklaşık yarısının, çift diskli sinerji yöntemi ile ESBL ürettiği gösterilmiş ve çok düşük düzeylerde üretilen ESBL'ler bile belirlenebildiği için bunun önerilebilir bir yöntem olduğu savunulmuştur (19). Ancak çift diskli sinerji yönteminin güvenilirliğini azaltan çeşitli faktörler de bildirilmiştir. Örneğin bazı suşlar tarafından yüksek düzeyde oluşturulan sefalosporinazların varlığı veya

Tablo 2. Disk Difüzyon Yöntemiyle Beta-Laktam Antibiyotiklere Orta Duyarlı Bulunan *K. pneumoniae* Suşlarında ESBL Saptananların Sayı ve Yüzdeleri

Antibiyotikler	ESBL Üreten Suşlar			
	Çift Diskli Sinerji Testi		Üç Boyutlu Test	
	n	(%)	n	(%)
Seftriakson	4	(31)	3	(23)
Sefotaksim	5	(39)	4	(31)
Seftazidim	2	(25)	1	(13)
Sefoksitin	1	(33)	1	(33)
Aztreonam	1	(8)	1	(8)

diskler arasındaki uzaklığın uygun olmaması sinerjik etkinin görülmesini önleyebilmektedir. Ayrıca klavulanik asid diskinde meydana gelebilecek potens kaybının da dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir (2). Son zamanlarda TEM ve SHV dışı bazı ESBL'lerin klavulanata dirençli olduğu bildirilmiştir (5,20). Çift diskli sinerji testinin esas klavulanat ile beta-laktam arasındaki yardımlaşmaya dayandığından bu tür ESBL taşıyan bakteriler bu yöntemle tespit edilemeyecektir.

TEM ve SHV kaynaklı ESBL'ler sefoksitini parçalamazlar; buna karşılık sefamisinazlar ve karbapenemazlar parçalarlar. Çalışmamızda ESBL ürettiğini saptadığımız 10 suştan yalnızca ikisi aynı zamanda sefoksitine dirençli bulunmuştur. Bu iki suşun TEM ve SHV dışı, diğer 8 suşun ise TEM ve SHV kaynaklı beta-laktamaz ürettiği düşünülebilir.

Şanlıdağ ve arkadaşları (21) *K. pneumoniae* suşlarında çift disk sinerji yöntemiyle ESBL üretme sıklığını %18, Töreci ve arkadaşları (22) %21.4, Abacıoğlu ve arkadaşları (23) %62.5, Büyükbaba ve arkadaşları (24) %43.2, Vahaboğlu ve arkadaşları (25) ise hastane kaynaklı Gram-negatif çomaklarda %24 olarak bildirmişlerdir. Abacıoğlu ve arkadaşları (26) nozokomiyal salgın döneminde yaptıkları bir çalışmada yenidoğan ünitesindeki 34 hastadan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının tümünün ESBL ürettiğini göstermişlerdir. Gür ve arkadaşları (27) hastane kaynaklı *K. pneumoniae* suşlarında ESBL üretme sıklığını %25 olarak bildirmişlerdir.

Yurtdışında yapılan çeşitli çalışmalarda *K. pneumoniae* suşları arasında ESBL üretme sıklığını Liu ve arkadaşları (28) %15.7, Sirot ve arkadaşları (19) ise 3 yıllık bir süre içerisinde %11.5-15.2 arasında saptadıklarını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada ESBL sıklığının Londra'da %11, Chicago'da %20, Bangkok'ta %50 olarak bulunduğu belirtilmiştir (10). Frans'a'da yapılan çeşitli çalışmalarda *K. pneumoniae* suşları arasında ESBL üretme sıklığının giderek arttığı gösterilmiş; bir çalışmada ESBL sıklığı 1985'te %0.74, 1987'de %8.4, 1988'de %11 olarak bulunduğu; 16 hastaneyi kapsayan diğer bir çalışmada ise bu oranın %9 olarak saptandığı bildirilmiştir (18). Thomson ve arkadaşları (16) ESBL oluşturduğu bilinen suşlarla yaptıkları araştırmalarında çift diskli sinerji yöntemi ile %79, üç boyutlu yöntem ile %93 oranında pozitif sonuç bildirmişlerdir.

Ülkemizde farklı yöntemlerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda Derbentli ve arkadaşları (29) hastane ortamından ve kolonize olmuş hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında ESBL üretme sıklığını üç boyutlu test ve çift diskli sinerji yöntemiyle sırasıyla %57 ve %40 olarak bildirmişlerdir. Eskitürk ve arkadaşları (30) çift diskli sinerji yöntemi ve E testini karşılaştırmalı olarak uyguladıklarında *Klebsiella* suşlarında ESBL üretme sıklığını her iki yöntemde de %54 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda hem çift diskli sinerji testi ile hem de üç boyutlu test ile 67 suşun 9'unda (%13) ve toplam olarak 10 suşta (%15) ESBL varlığı gösterilmiştir.

Çift diskli sinerji yönteminde diskler arasındaki uzaklığın deneyin sonucunu etkilediği, bazen ESBL oluşturan suşlarla yapılan ve diskler arasındaki uzaklığın 30 mm olarak ayarlandığı deneylerde yalancı negatif sonuçlar elde edildiği bildirilmekte ve böyle durumlarda diskleri yakınlılaştırarak deneyin tekrarlanması önerilmektedir. Nitekim



Resim 3. Üç boyutlu test.

Gülay ve arkadaşları (31) yaptıkları çalışmada hastane infeksiyonlarından soyutlanmış 44 *K. pneumoniae* suşunda çift diskli sinerji yöntemiyle ESBL üretme sıklığını diskler arası mesafe 30 mm olarak uygulandığında %56.8, 20 mm olarak uygulandığında ise %88.6 olarak saptandığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda diskler arasındaki mesafe 20 mm olacak şekilde ayarlanmıştır.

TEM ve SHV dışı beta-laktamazların çoğunluğu, özellikle karbapenemazlar ve sefamisinazlar, klavulanata dayanıklıdır. Çift diskli sinerji testi, 3. kuşak sefalosporinler ve aztreonamın klavulanatla yardımlaşması temeline dayanmaktadır. Bu nedenle bu yöntemle klavulanata dayanaklı ESBL'lerin saptanamayacağını düşünmek doğaldır. Thomson ve arkadaşları (16)'nın yukarıda sözü edilen çalışmayı yaptıkları 1992 yılında TEM ve SHV dışı ESBL'ler henüz tanımlanmaya başlamış; ancak 1995 yılındaki Bush sınıflamasında yerini almıştır. Derbentli ve arkadaşları (29) ise 1996 yılında yaptıkları çalışmada TEM ve SHV dışı ESBL türlerini saptamamışlardır. Bu iki çalışmada üç boyutlu test ile ESBL oranının çift diskli sinerji yöntemine göre daha yüksek bulunması, yukarıda bahsedilen TEM ve SHV dışı ESBL'lerin çift diskli sinerji yöntemi ile saptanamamasına bağlı olabilir. Çalışmamızda sefoksitine dirençli olması nedeni ile TEM ve SHV dışı ESBL taşıdığını düşündüğümüz 2 suştan birisi üç boyutlu test ile pozitif, çift diskli sinerji testi ile negatif sonuç vermiştir. Sonuç olarak çalışmamızda her iki yöntemle de aynı oranda ESBL pozitifliği saptanmasını, ESBL'lerin çoğunun (8/10) TEM ve SHV kaynaklı olmasına bağlamaktayız. Üç boyutlu test ve çift diskli sinerji testi sonuçları karşılaştırıldığında, ESBL tespitinde arada fark olmaması, buna karşılık üç boyutlu testin uygulamasının teknik olarak zor olması ve hata kaynaklarının çokluğu nedeniyle, klinik laboratuvarlarında çift diskli sinerji yönteminin kullanılmasını önermekteyiz. Ancak gelecekte ESBL türlerinin uygun yöntemlerle saptandığı bakteri suşlarında iki yöntemin karşılaştırılması bu konuda daha kesin bilgiler edinilmesini sağlayacaktır.

Son zamanlarda kromozom kaynaklı ESBL üretimi olduğu bildirilmekle beraber, ESBL üretimi genellikle plazmid kaynaklı olduğu için bakteriler arasında kolayca yayılabilmekte, bu da zaman içerisinde ESBL üretme oranında artmaya yol açmaktadır (7). ESBL oluşturan bakterilerin oranı, ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye, hastaneden hasta-

neye, hatta aynı hastane içinde çeşitli birimler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık lokal epidemiyolojik faktörlere, genel infeksiyon kontrol önlemlerine ve antibiyotik kullanım politikalarına bağlanmaktadır. Hastanelerde geniş spektrumlu beta-laktamlara direnç varlığının belirlenmesi ve bu direncin izlenmesi, nozokomiyal infeksiyon epidemilerinin ortaya çıkmasını ve yayılmasını azaltmada yararlanılması gereken bir kontrol yöntemidir. Antibiyotiklere karşı direncin en düşük düzeye indirilebilmesi için bu antibiyotiklerin mikrobiyolojik veriler göz önüne alınarak ve antibiyotik kullanım prensiplerine uygun olarak kullanılması gerekmektedir.

Disk difüzyon yöntemi ile seftriaksona orta derecede duyarlı bulunan 4 suşun, seftoksime orta derecede duyarlı bulunan 5 suşun, seftazidime orta derecede duyarlı bulunan 2 suşun, seftoksime ve aztreonama orta derecede duyarlı bulunan 1'er suşun çift diskli sinerji testi ile ESBL ürettiğinin gösterilmesi, disk difüzyon yönteminin bakteriyel direnci saptamada yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Seftoksime mikrodilüsyon ve E testi ile duyarlı ve orta derecede duyarlı bulunan suşlarda çift diskli sinerji testi ile ESBL üretimi gösterilmiştir. Bu durum minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) saptamaya yarayan yöntemlerle de yanlış sonuçlar alınabileceğini göstermektedir.

E testi yöntemi disk difüzyon yöntemi ile dilüsyon yöntemlerinin bir kombinasyonu olarak kabul edilmektedir. E testi yönteminin referans yöntemlerle karşılaştırılması amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda E testi sonuçları ile mikrodilüsyon ve disk difüzyon sonuçları arasında yüksek oranda uyumluluk bildirilmiştir (14,32-34).

Çalışmamızda disk difüzyon yöntemiyle beta-laktam antibiyotiklere orta derecede duyarlı olarak bulunan *K. pneumoniae* suşlarının önemli bir kısmı mikrodilüsyon yöntemi ve E testi ile dirençli bulunmuştur. Ayrıca disk difüzyon yöntemiyle seftoksime ve seftazidime orta derecede duyarlı bulunan suşların yanı sıra, duyarlı bulunan bazı suşlar da mikrodilüsyon ve E testi yöntemleriyle orta derecede duyarlı veya dirençli bulunmuştur.

Hastane ortamından izole edilen Gram-negatif bakterilerde antibiyotik duyarlılığının mikrodilüsyon yöntemiyle ortaya konması, beta-laktamaz üretimine bağlı gerçek direncin saptanmasında ortaya çıkacak başarısızlığı önleyecektir. Mikrodilüsyon yönteminin pratik olmaması ve uygulanma zorluğu, E testi ile MİK düzeyinin saptanmasını ön plana çıkarmaktadır. Ancak bunun yerine hastane ortamından izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında ESBL varlığı güvenle kullanılabilir ve pratik uygulama kolaylığı olan çift diskli sinerji testi ile araştırılmalıdır.

Teşekkür

Üç boyutlu testte kesi işlemi için kullanılan aletin yapılımasında yardımlarını esirgemeyen Taşkızak Tersanesi Komutanlığı'na ve ilgili birim personeline teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Keskin K. Yeni bir antibiyotik duyarlılık testi: E-Test. In: Ağaç fidan A, Badur S, Güleççi G, eds. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-10 Mayıs 1996, Antalya) Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti & Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 1996: 25: 48-51

- Moland ES, Thomson KS. Extended spectrum β -lactamases of Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:666-8.
- Stratton CW. Activity of β -lactamases against β -lactams. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22 (Suppl A): 23-35
- Sanders CC. β -Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992;14:1089-99
- Sirot D. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36 (Suppl A): 19-34
- Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase not derived from TEM-or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* 1992; 28:590-2
- Jacoby GA. Genetic of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (Suppl 1): 2-11
- Payne DJ, Woodford N, Amyes SGA. Characterization of the plasmid mediated β -lactamase BIL-1. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30:119-27
- Akova M. Beta-Laktamazlara Bağlı Antibiyotik Direnci. Sorunlar ve Çözüm Önerileri. İstanbul: MSD İlaçları, 1995:2-4
- Quinn JP. Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (Suppl 1): 39-42
- Katsanis G, Jacoby G. The frequency of extended-spectrum β -lactamases in isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 345-53
- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (Suppl 1): 17-29
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. 4th ed. Approved Standard. NCCLS Document M2-A4. Villanova, Pa: NCCLS, 1990
- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thomsberry C. Comparison of E test to agar dilution, broth microdilution and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 533-8
- Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA. Problems with detection of β -lactam resistance among nonfastidious gram negative bacilli. *Infect Dis Clin North Am* 1993; 7: 411-23
- Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1877-82
- Thomson KS, Mejlo ZA, Pearce GN, Regan TJ. 3-dimensional susceptibility testing of β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13:45-54
- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1697-704
- Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of family Enterobacteriaceae: a 3 years in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1677-81
- Tzouveleki LS, Tzelepi E, Mentis AF, Tsakris A. Identification of a novel plasmid-mediated beta-lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 645-54
- Şanlıdağ T, Saygı G, Özçelik S, Çakır N, Çeliksöz A. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında extended board spectrum beta-laktamazların araştırılması [Özet]. *Ankem Derg* 1996; 10: 120
- Töreci K, Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N. Enterobacteriaceae ailesinde ard arda izole edilen 827 suşta genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturma sıklığı [Özet]. *Ankem Derg* 1996; 10: 121
- Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. Extended-spectrum beta-lactamases saptanmasında E test ile çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. *İnfeks Derg* 1995; 9: 93-5
- Büyükbaba Ö, Aydın D, Anđ Ö. İdrar yolu infeksiyonu etkeni Gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi. *Klimik Derg* 1996; 9: 27-30

25. Vahaboğlu MH, Mülazımoğlu L, Erdem İ, Yıldırım İ, Taşer B, Avkan V. Taksim Hastanesinde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin surveyansı. *Klimik Derg* 1993; 6: 79-82
26. Abacıoğlu YH, Aslani MM, Gülay Z, İnsan S, Yuluğ N. Resistotyping and plasmid profile analysis of multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated during a nosocomial outbreak. *İnfeks Derg* 1995; 9: 63-6
27. Gür D, Pitt TL, Hall LMC, Akalin HE, Livermore DM. Diversity of *Klebsiella* with extended spectrum beta-lactamases at a Turkish University Hospital. *J Hosp Infect* 1992; 22: 163-8
28. Liu PP, Gür D, Hall LMC, Livermore DM. Survey of prevalence of β -lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at The Royal London Hospital. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30:429-47
29. Derbentli Ş, Katrancı H, Nakiboğlu Y. Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu β -laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. *Ankem Derg* 1996; 10:1-13
30. Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde geniş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) direnci sıklığının araştırılması [Özet]. *Ankem Derg* 1996; 10:14
31. Gülay Z, Abacıoğlu H, Yuluğ N. Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi. *İnfeks Derg* 1995; 9: 89-92
32. Miller L, Rittenhouse S, Utrup L, Poupard J. Comparison of three methods for determination of a single MIC of an antimicrobial agent. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1373
33. Brown DFJ. E test symposium: summation. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 489
34. Macias EA, Mason EO, Ocera HY, Larocco MT. Comparison of E-test with standard broth microdilution for determining antibiotic susceptibilities of penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:430-2